

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian (Ruang Analisis Pati dan Karbohidrat), Laboratorium Pengolahan Limbah Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biomassa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada bulan April sampai dengan bulan Juni 2014.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *rotary vacuum evaporator*, spektrofotometer merk Varian tipe *cary 50 probe*, Sentrifius merk Hitachi tipe CF16RX II, *shaker*, pH meter, timbangan, botol gelap, mikro pipet, pipet tip, baskom, penumbuk kayu, dan alat-alat gelas.

Bahan baku yang digunakan adalah tanaman hati ungu (*Tradescantia Pallida*) yang diperoleh dari Bandar Lampung, dan bahan pembantu seperti kain saring, kertas saring, dan alumunium foil. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis antara lain: katekol, metanol, asam klorida, KCl, asam sitrat, natrium sitrat, dan air suling.

### **3.3 Metode Penelitian**

Percobaan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) yang disusun secara faktorial (3 x 6) dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah rasio molar katekol terhadap antosianin (R), yaitu 0:1 (R0), 50:1 (R1) dan 100:1 (R2). Faktor kedua adalah lama penyimpanan (L), yaitu hari ke-0 (L0), hari ke-10 (L1), hari ke-20 (L2), hari ke-30 (L3), hari ke-40 (L4), dan hari ke-50 (L5). Data yang diperoleh diuji kemenambahan datanya dengan menggunakan uji Tuckey dan kesamaan ragam data diuji dengan menggunakan uji Bartlet. Data dianalisis dengan analisis ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan, kemudian untuk mengetahui perlakuan terbaik pengujian dilanjutkan dengan perbandingan polinomial ortogonal pada taraf uji 5% (Steel dan Torrie, 1991).

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan bahan**

##### **1) Perhitungan kadar air tanaman hati ungu**

Tanaman hati ungu segar dipotong-potong dan ditentukan kadar airnya. Kadar air tanaman hati ungu yang digunakan pada penelitian ini dianalisis dengan menggunakan metode oven (AOAC, 1970), yaitu sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan alumunium yang telah diketahui beratnya. Sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105°C selama 3 – 5 jam. Sampel diambil dan dinginkan di dalam desikator selama 15 menit dan kemudian

ditimbang. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit, lalu sampel didinginkan di dalam desikator selama 15 menit dan kemudian ditimbang kembali. Perlakuan ini dilakukan sampai mencapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,0002 g). Banyaknya kandungan air dalam bahan didapat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (bb) (\%)} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

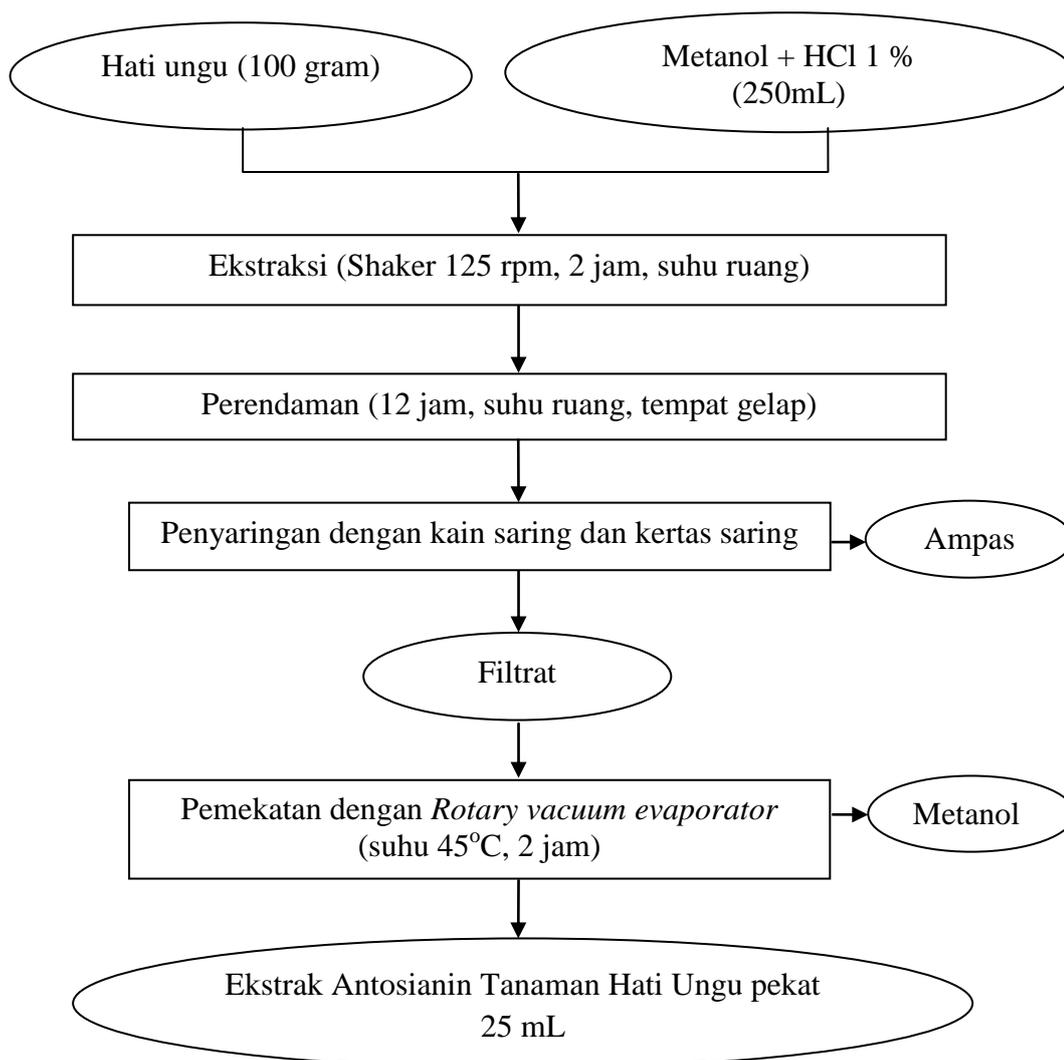
## 2) Pembuatan larutan *buffer* pH 1, pH 3,5 dan pH 4,5

*Buffer* HCl-KCl pH 1 dibuat dengan cara mencampurkan 50 mL larutan HCl 0,2 M dengan 97 mL larutan KCl 0,2 M, dan kemudian diencerkan dengan menambahkan air suling hingga volume 200 mL (Sudarmadji *et al.*, 1997). *Buffer* sitrat pH 3,5 dibuat dengan cara mencampurkan 40 mL larutan asam sitrat 0,1 M dengan 11 mL larutan natrium sitrat 0,1 M, dan kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL (Sudarmadji *et al.*, 1997). *Buffer* sitrat pH 4,5 dengan cara mencampurkan 28 mL larutan asam sitrat 0,1 M dengan 23 mL larutan natrium sitrat 0,1 M, dan kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL (Sudarmadji *et al.*, 1997).

### 3.4.2 Ekstraksi pigmen antosianin hati ungu

Ekstraksi pigmen antosianin dilakukan, mengikuti metode yang dikemukakan oleh Gao dan Mazza (1996). Sebanyak 100 gram potongan daun dan batang hati ungu dimasukkan ke dalam erlenmayer 500 mL, kemudian ditambahkan 250 mL metanol yang telah diasamkan dengan 2,5 mL HCl 1%. Selanjutnya campuran diekstrak dengan bantuan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 2 jam. Larutan kemudian disimpan semalam di ruang gelap pada suhu ruang, setelah itu

disaring dengan menggunakan kain saring dan filtrat disaring kembali dengan menggunakan kertas saring biasa. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45°C selama 2 Jam, dan dihasilkan pekatan ekstrak antosianin tanaman hati ungu. Diagram alir proses ekstraksi pigmen antosianin tanaman hati ungu dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir proses ekstraksi pigmen antosianin hati ungu  
Sumber : Metode Gao dan Mazza (1996).

Pekatan ekstrak antosianin tanaman hati ungu kemudian diambil cuplikan untuk mengukur konsentrasi awal antosinin ekstrak tanaman hati ungu yang ditentukan secara spektrofotometri.

### 3.4.3 Kopigmentasi ekstrak antosianin tanaman hati ungu dengan katekol

Pekatanan ekstrak antosianin tanaman hati ungu sebanyak 25 mL ditambahkan ke dalam *buffer* sitrat pH 3,5 sebanyak 3 kali volume pekatan (25 mL) untuk mendapatkan larutan dengan pH kopigmentasi (pH 3.5). Endapan dipisahkan dengan menggunakan *centrifuge* kecepatan 10.000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit. Filtrat yang dihasilkan merupakan ekstrak antosianin tanaman hati ungu.

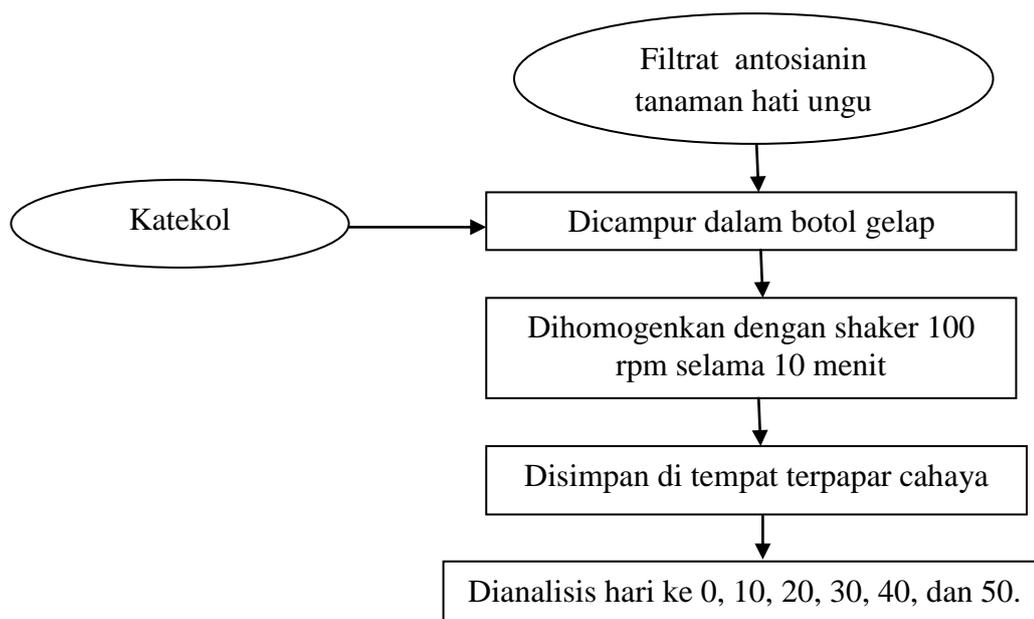
Jumlah kopigmen katekol yang akan ditambahkan dihitung sesuai dengan masing-masing perlakuan rasio molar kopigmen terhadap antosianin (50:1 dan 100:1) dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah kopigmen} = C \times \text{BM} \times V/1000 \times R$$

Keterangan :

C	= Konsentrasi antosianin awal (mMol/L)
BM	= Berat molekul (BM katekol = 110,11 mg/mMol)
V	= Volume sampel
R	= Rasio molar 50:1 dan 100:1

Kopigmentasi dilakukan dengan cara memasukkan 5 mL ekstrak antosianin tanaman hati ungu ke dalam botol gelap dan kemudian ditambahkan katekol 12,14 mg dan 24,28 mg masing masing untuk ratio 50: 1 dan 100: 1. Botol sampel kemudian ditutup dan homogenkan dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit hingga katekol larut dan bercampur dengan ekstrak. Masing-masing sampel disimpan di tempat yang terpapar cahaya dan dianalisis pada hari ke 0, 10, 20, 30, 40, dan 50. Diagram alir proses kopigmentasi antosianin dengan katekol dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Diagram alir proses kopigmentasi antosianin dengan katekol dan pengamatan.

### 3.5 Pengamatan

#### 3.5.1- Pengamatan efek batokromik dan hiperkromik

Sampel antosianin yang tidak dikopigmentasi (rasio molar 0:1) dan antosianin terkopigmentasi (50:1, dan 100:1) dimasukkan ke dalam 6 mL larutan buffer pH 3,5 sampai absorbansi pada pengukuran  $\lambda$  525 nm berada antara 0,4 – 0,8.

Kemudian absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer (*scanning*) pada berbagai panjang gelombang 450 nm – 600 nm sampai diperoleh Absorbansi tertinggi ( $A_{\lambda_{max}}$ ) (Rein, 2005). Analisis *scanning* dilakukan pada hari ke – 10 dan hari ke – 50 untuk mengamati peningkatan absorbansi maks (hiperkromik) dan pergeseran  $\lambda$  maks (batokromik). Analisis *scanning* awal dilakukan pada hari ke – 10 dikarenakan agar antosianin yang ditambahkan dengan katekol sudah terkopigmentasi.

### 3.5.2 Analisis konsentrasi antosianin

Konsentrasi antosianin dinyatakan sebagai sianidin-3-glukosida ditentukan dengan metode perbedaan pH pada spektrofotometer (Giusti dan Worlstad, 2001). Sebanyak 0,5 mL ekstrak antosianin yang tidak dikopigmentasi (rasio molar 0:1) dan antosianin terkopigmentasi (rasio molar 50:1, dan 100:1) dimasukkan ke dalam larutan *buffer* pH 1 dan 4,5 masing-masing 6 mL. Masing-masing sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  525 nm dan 700 nm dengan blanko air suling. Konsentrasi antosianin dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Absorban sampel (A)} = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$$

$$\text{Total Antosianin (mMol/L)} = (A \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

$$\text{Total Antosianin (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Keterangan :

$A_{\lambda_{\text{max}}}$  = Absorban pada panjang gelombang maksimal

MW Sianidin 3-glukosida = 449,2 g/mol

DF = Faktor pengenceran

Konstanta absorptivitas molar =  $\epsilon = 26.900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Konsentrasi antosianin sesuai perlakuan dianalisis dan dihitung sama dengan cara menentukan konsentrasi awal antosianin sesuai dengan langkah maupun perhitungan di atas.

### 3.5.3 Retensi warna

Perubahan warna antosianin akibat adanya kopigmentasi selama penyimpanan diamati melalui pengamatan absorban warna ekstrak antosianin tanaman hati ungu tidak dikopigmentasi maupun dikopigmentasi pada larutan buffer 3,5 dan  $\lambda$  525 nm. Menurut Shi *et al.* (1992a), ekstrak antosianin tanaman hati ungu lebih stabil pada pH 3,5 dibandingkan dengan pH 4,5 dan pH 5,5. Retensi warna selama penyimpanan dihitung dengan rumus :

$$\text{Retensi Warna (\%)} = (A_t/A_0) \times 100\%$$

Keterangan :

$A_0$  : absorban pada hari ke-0

$A_t$  : absorban pada hari ke-t (Rein dan Heinonen, 2004).

### 3.5.4 Kinetika reaksi

Reaksi degradasi antosianin mengikuti kinetika reaksi ordo satu, dan perhitungan parameter kinetik dari degradasi antosianin pada suhu pemanasan 65°C dalam waktu 8 jam diukur pada panjang gelombang 525 nm. Pengujian kinetika degradasi antosianin dilakukan dengan melarutkan 0,5 mL pekatan antosianin tanaman hati ungu ke dalam 6 mL larutan buffer untuk masing-masing pH (Shi *et al.*, 1992c). Larutan antosianin dipanaskan menggunakan penangas air pada suhu 65°C selama 8 jam dengan interval waktu 2 jam larutan diukur absorbansinya.

Konstanta laju reaksi ordo pertama ( $k$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) yaitu waktu yang diperlukan untuk degradasi dari 50% dari antosianin, yang dihitung dengan menggunakan persamaan laju reaksi ordo satu sebagai berikut:

$$\frac{dc}{dt} = -k c$$

$$\frac{dc}{c} = -k dt$$

$$\int_0^t \frac{dc}{c} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{ct}{c_0} = -k (t - t_0)$$

$$\ln \frac{ct}{c_0} = -k t$$

pada  $t = t_{1/2}$        $\ln 0,5 = -k t_{1/2}$

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k}$$

Keterangan :

$C_0$  adalah konsentrasi awal antosianin

$C_t$  adalah konsentrasi antosianin setelah pemanasan waktu  $t$  (Kopjar dan Pilizota, 2009).